

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04982

研究課題名(和文)糖鎖模倣ペプチドIF7による腫瘍標的抗癌剤の研究開発

研究課題名(英文) Research and development of the tumor target anticancer agent using carbohydrate mimic peptide IF7

研究代表者

杉原 一廣 (Sugihara, Kazuhiro)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00265878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍の新生血管内皮細胞の特異的分子Annexin 1 (Anxa1)を標的として抗腫瘍薬の運搬を担うペプチドIF7の有効性を確認した。次に、IF7とパクリタキセル(TXL)を結合した高純度の新規抗癌剤IF7-TXLを合成し、その抗腫瘍効果を担がんマウスを用いて検証した。IF7の将来性を考慮して、D-type IF7を合成し、新しい薬効に基づいたハイブリッドペプチド型の抗腫瘍薬を開発した。この新規ペプチド薬剤が、優れた抗腫瘍効果を示すことを精度の高い薬効試験で検討し確認した。

研究成果の概要(英文)：IF7 bound to annexin 1 (Anxa1), which the endothelial surface receptor. Because Anxa1 is a highly specific tumor vasculature surface marker, we confirmed that the IF7 peptide could target anticancer drugs to the tumor vasculature. Then, we synthesized highly-pure new anticancer drug IF7-TXL which conjugate paclitaxel (TXL) with IF7 and investigated the antitumor effect using a cancer bearing mouse. In consideration of a future of IF7, we synthesized D-type IF7 and developed the antineoplastic agent of the hybrid peptide type based on new efficacy. We showed excellent antitumor effect in a highly-detailed pharmacological test.

研究分野：産婦人科学

キーワード：DDS型抗腫瘍薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の細胞表面に発現する糖鎖抗原が、腫瘍の悪性度や生存率と相関することが明らかにされてきたが、糖鎖そのものを薬剤として癌を治療した報告はない。その主な理由は、複雑な糖鎖を簡単に合成できない技術面での課題である。

我々のグループは、研究開始当初までに細胞表面特異的に発現する分子を標的とする蛋白や糖鎖を mimic するペプチドを同定し、機能解析や創薬、「新規分子標的治療薬」の開発を進め、報告している(Sugihara K. *et al. Nature Commun.* 2014, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007, 2009, 2011.)。トランスレーショナル・リサーチを進めてきた成果として、モノクローナル抗糖鎖抗体を標的とし Peptide Displaying Phage Technology を駆使してスクリーニングを行い、いくつかの糖鎖を認識するペプチドを同定した (*Proc Natl Acad Sci USA.* 2009)。同定したアミノ酸 7 残基のペプチド **IF7 (IFLLWQR)** は、ペプチド・アフィニティクロマトグラフィーの結果、腫瘍新生血管内皮細胞の血流側表面に発現する Annexin 1 (Anxa1) 特異的に結合することを見いだすに至った (*Proc Natl Acad Sci USA.* 2011, 特許 2012-546245 各国移行)。このような背景に基づき本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

我々は癌細胞表面の糖鎖構造と血管内皮細胞表面に発現する糖鎖認識受容体の相互作用を解析する過程で、腫瘍新生血管内皮に発現する Annexin 1 (Anxa1) 特異的に結合する糖鎖模倣ペプチド「**IF7**」を同定した。このことは、腫瘍形成に係る腫瘍新生血管を標的とする治療及び診断への **IF7** の有用性を示唆する。実際に、**IF7** と結合した抗癌剤は腫瘍にのみ集積し、さらに投与量を減量しても顕著な抗腫瘍効果を示した。本研究では、**IF7** の成果をさらに発展させ「新規抗癌剤」の研究・開発を進め創薬の実現を目指すことが目的である。

### 3. 研究の方法

(1) 腫瘍新生血管血流側に特異的に発現する Anxa1 を標的とするペプチド「**IF7**」と新たに同定する D-type ペプチドが確かに標的分子に作用することを確認した。

(2) 今までの創薬研究の成果を踏まえて、ペプチド創薬を進め、抗腫瘍薬として SN38 の他にパクリタキセルを **IF7** と conjugate し、新規の DDS 型分子標的治療薬を合成する。

婦人科関連腫瘍に対して開発・合成した薬剤の薬理効果の検証を行った。

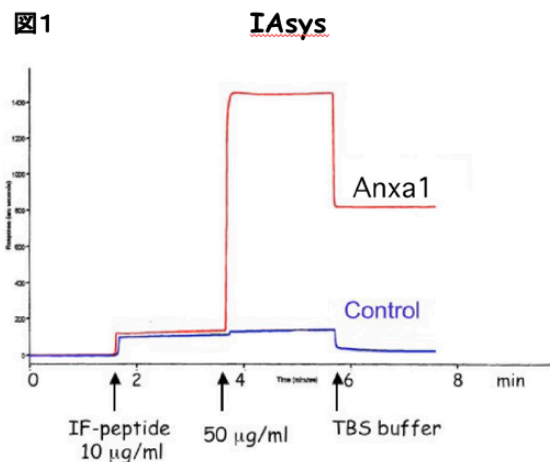
(3) さらに、研究当初は、予定していなかった新規抗腫瘍薬の開発を実施し優れた結果を得ている(研究期間中に 2 件の特許申請済)。

### 4. 研究成果

(1)

#### **IF7 と Anxa1 相互作用の検証**

悪性腫瘍血管内皮血流側に発現する Anxa1 と **IF7** が強固なアフィニティを示すことを確認する目的で、生体分子相互作用解析システム **IAsys (Affinity Sensors)** を用い検証した (図 1)。



(2)

#### **新規抗腫瘍薬 IF7-TXL の合成に成功**

**IF7** は、SN38 と組み合わせることで腫瘍特異的に集積し、かつ優れた抗腫瘍効果を示した (Hatakeyama S., Sugihara K. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*)。しかし、抗癌剤 SN38 は、薬剤の特性である難溶性の課題があり、製剤化に更なる工夫を必要である。そこで、SN38 より溶解性に優れた薬剤パクリタキセル (Paclitaxel: TXL) と **IF7** を conjugate し新規 DDS 型分子標的薬剤の合成を試み、薬効試験に充分使用できる高純度の試薬 (**IF7-TXL**) の合成に成功した (図 2-4)。

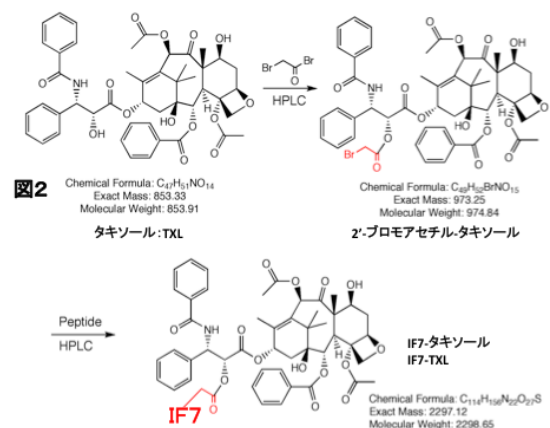


図3

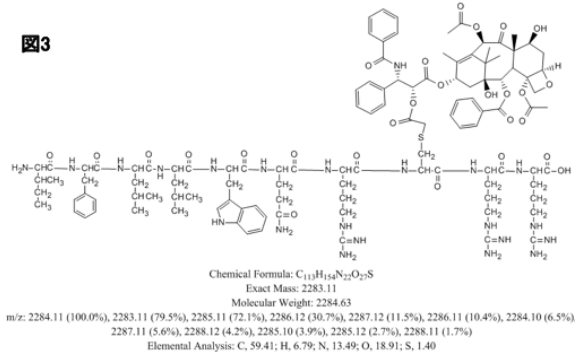
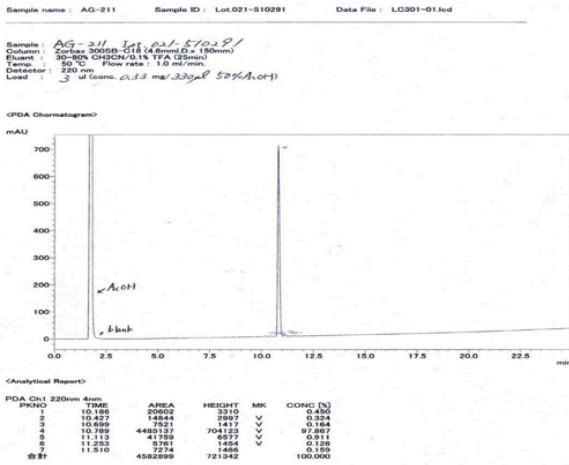


図4



(3)

**IF7-TXE の抗腫瘍効果に対する薬効試験**

Lenti virus を感染させ luciferase を形質導入した、卵巣癌由来培養株 (OVCAR3-Luc 細胞) を作製した。SCID マウスの皮下に形質導入した培養細胞 ( $1 \times 10^6$  cells) を移植して、担癌状態のマウスを作成し、腹腔内に luciferin を投与するとマウスの ATP を用いて、腫瘍細胞はその生存細胞数に応じて発光する。新規 DDS 型分子標的治療薬である IF7-TXL を尾静脈から投与後、IVIS® Imaging System で腫瘍細胞の発光量 (photon number) を精密に計測し、抗腫瘍効果を定量的に判定したところ、IF7-TXL は一定の抗腫瘍効果を示した (図 5)。さらに、薬剤投与過程でマウスの体重測定を行ったところ、顕著な副作用は認めなかった (図 6)。

図5 6 times treatment everyday

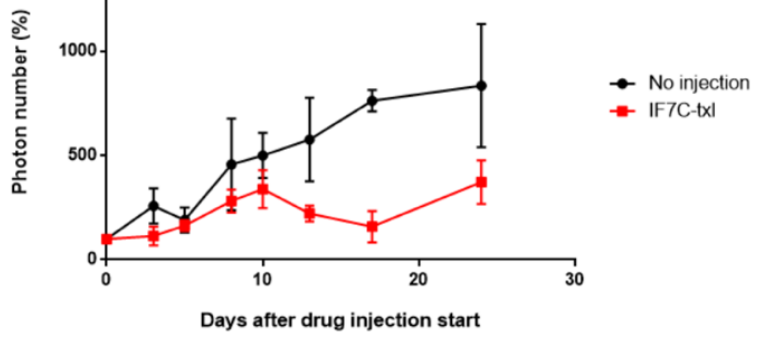
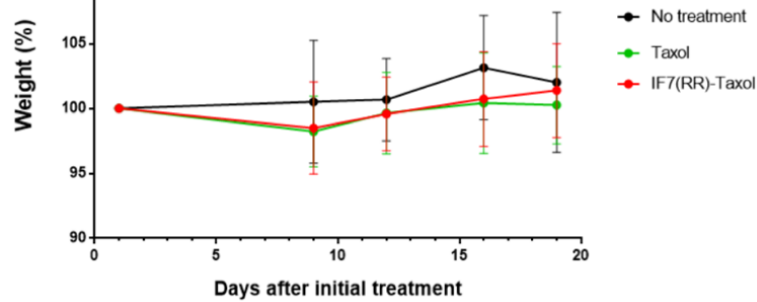


図6

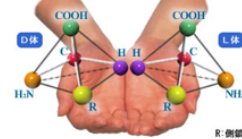


(4)

**D-type ペプチド**

腫瘍新生血管血流側に特異的に発現する Annexin I を標的とする IF7 ペプチド (L-type) の鏡面異性体である D-type IF7 ペプチドを合成した (図 7)。

図7



(5)

**新規抗腫瘍薬の開発**

研究期間中に、血管内皮細胞に取り込まれる (インターナリゼーションされる) 新規抗腫瘍薬を開発した。薬剤は、標的細胞にインターナリゼーション後、エンドソームに取り込まれることが判明した。エンドソームに取り込まれた状態では、開発した薬剤の最終標的オーガンをミトコンドリアのため、薬理効果を発揮できない。そこで、エンドソームの膜を破壊するペプチドと細胞質でミトコンドリアの膜を破壊するペプチドをタンデムに結合し、新規薬剤を考案した。つまり、①targeting vehicle として機能する薬剤+②エンドソームを破壊する薬剤+③ミトコンドリア膜を破壊し標的細胞にアポトーシスを誘導する機能をもつハイブリッドペプチドを開発し、薬効試験を実施した (図 8)。

その結果、顕著な抗腫瘍効果を確認し、さらに、本薬剤が生存率も改善することを明らかにし(図9)、本研究期間最終年度である平成29年度に、特許出願を終えている。

図8

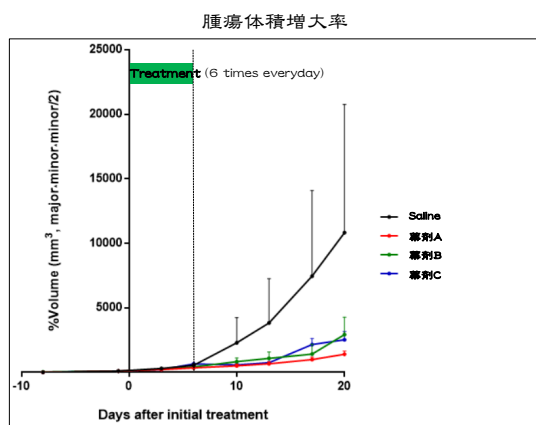
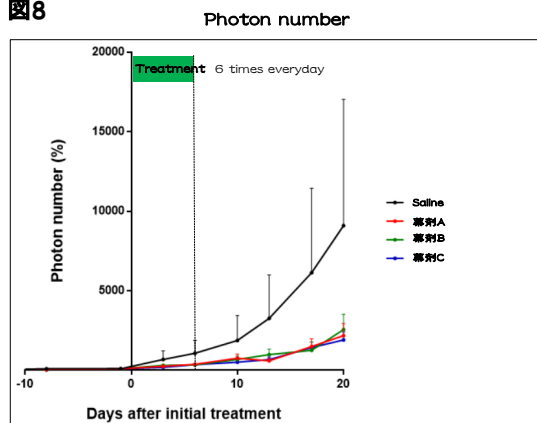
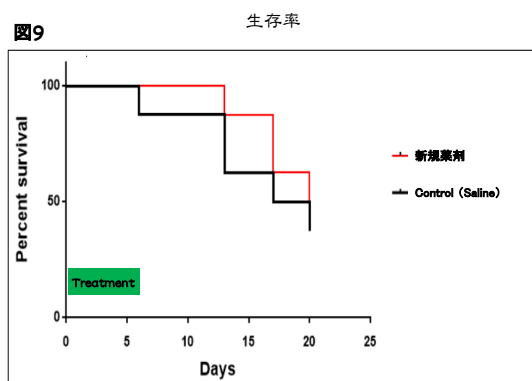
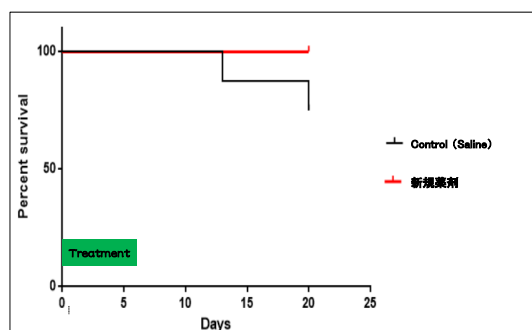


図9



腫瘍増大率10倍で安楽死とし、20日で観察を切った場合  
生存率



腫瘍増大率20倍で安楽死とし、20日で観察を切った場合  
生存率

5. 主な発表論等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

- (1) Farhana M, Tamura N, Mukai M, Ikuma K, Koumura Y, Furuta N, Yaguchi C, Uchida T, Suzuki K, Sugihara K, Ioh H, Kanayama N:  
Histological characteristics of the myometrium in the postpartum hemorrhage of unknown etiology -A possible involvement of local immunereactions.  
*J Reprod Immunol.* 査読あり, 110:74-80. 2015.  
doi: 10.1016/j.jri.2015.04.004. Epub 2015 May 21.
- (2) Matsuya M., Sugihara K, Yaguchi C, Ito H, Kitamura H, Kanayama N, Arahori K: Leiomyomatosis peritonealis disseminata with aromatase cytochrome P450 expression in a postmenopausal woman: a case study with literature review.  
*European journal of gynaecological oncology.* 査読あり, *in press.*
- (3) Yaguchi C, Itoh H, Tsuchiya KJ, Furuta-Isomura N, Horikoshi Y, Matsumoto M, Jeenat FU, Keiko MK, Kohmura-Kobatachi Y, Tamura N, Sugihara K, Kanayama N:  
Placental pathology predicts infantile physical development during first 18 months in Japanese population: Hamamatsu birth cohort for mothers and children (HBC Study).  
*PLoS One.* 査読あり, 2018. 10;13(4): e0194988.  
doi:10.1371/journal.pone.0194988. eCollection 2018.

[学会発表] (計7件)

- (1)  
発表者名: 杉原 一廣  
発表課題: ペプチド創薬  
学会名: 第2回中日本産婦人科セミナー (招請講演)  
発表年月日: 2015年7月4日  
発表場所: 富山
- (2)  
発表者名: 杉原 一廣  
発表課題: 子宮内膜症に対するペプチド治療薬の探索  
学会名: 第32回日本DDS学会学術集会  
発表年月日: 2016年6月30日~7月1日  
発表場所: 静岡

- (3)  
発表者名：杉原 一廣  
発表課題：ペプチド創薬  
学会名：藤田保健衛生大学セミナー  
(招請講演)  
発表年月日：  
2016年8月22日  
発表場所：名古屋
- (4)  
発表者名：Shibata T, Sugihara K  
発表課題：Pro-apoptotic peptides as potential  
treatment for endometriosis. 5th  
Asian Conference on  
Endometriosis.  
学会名：5th Asian Conference on  
Endometriosis.  
発表年月日：  
September 22-24, 2016.  
発表場所：Osaka, Japan.
- (5)  
発表者名：杉原 一廣  
発表課題：産婦人科生殖腫瘍分野のトラン  
スレーショナルリサーチ  
学会名：社会医療法人蘇西厚生会学術講  
演会  
(招請講演)  
発表年月日：  
2016年10月18日  
発表場所：岐阜
- (6)  
発表者名：杉原 一廣  
発表課題：腫瘍血管新生、VEGF、ベバシズ  
マブ  
学会名：第2回婦人科腫瘍勉強会  
発表年月日：  
2016年11月30日  
発表場所：静岡
- (7)  
発表者名：Shibata T, Sugihara K  
発表課題：Enhancement of human sperm  
motility by novel recombinant  
endo-β-galactosidases.  
学会名：The society for reproductive  
investigation's 64<sup>th</sup> annual scientific  
meeting (SRI 2017).  
発表年月日：  
March, 2017.  
発表場所：Orland USA.

- [産業財産権]  
○出願状況 (計2件)
- (1)  
名称：細胞殺傷剤  
発明者：杉原 一廣、金山 尚裕、  
小野寺雄一郎、福田 道子、  
野中 元裕  
権利者：浜松医科大学、  
産業技術総合研究所  
種類：特許  
番号：特願 2017-161556
- (2)  
名称：細胞殺傷剤  
発明者：杉原 一廣 金山 尚裕、  
柴田 俊章、小野寺 雄一郎  
権利者：浜松医科大学  
種類：特許  
番号：特願 2018-001063
- 6.研究組織
- (1)  
研究代表者  
杉原 一廣 (SUGIHARA, Kazuhiro)  
浜松医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00265878
- (2)  
研究分担者  
村上 浩雄 (MURAKAMI, Hirotake)  
浜松医科大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：10432212
- 柴田 俊章 (SHIBATA, Toshiaki)  
浜松医科大学・医学部・助教  
研究者番号：50529568